

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

0 289 930
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 88106748.2

(51)

Int. Cl.⁴: **C12P 21/00** , **C07K 15/00** ,
C12N 15/00 , **C12N 5/00** ,
G01N 33/577 , **G01N 33/68**

(22)

Anmeldetag: 27.04.88

Der Anmelder hat eine Erklärung nach Regel 28 (4) EPÜ (Herausgabe einer Probe nur an einen Sachverständigen) eingereicht.
Eingangsnummer(n) der
Hinterlegung(en): ECACC 87042308.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: SP
+ GR.

(30)

Priorität: 02.05.87 DE 3714633

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
09.11.88 Patentblatt 88/45

(84)

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71)

Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur**
Förderung der Wissenschaften e.V.
Bunsenstrasse 10
D-3400 Göttingen(DE)

(72)

Erfinder: **Brocks, Dietrich, Dr.**
Goethering 9
D-6200 Wiesbaden(DE)
Erfinder: **Pünter, Jürgen, Dr.**
Reichenberger Weg 11
D-6238 Hofheim am Taunus(DE)
Erfinder: **Strecker, Helmut, Dr.**

Verstorben(DE)
Erfinder: **Timpl, Rupert, Dr.**
Julius-Haerlingstrasse 3
D-8035 Gauting(DE)

(54)

Monoklonaler Antikörper zur selektiven immunologischen Bestimmung von Intaktem Prokollagen Peptid (Typ III) und Prokollagen (Typ III) in Körperflüssigkeiten.

(57)

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers der spezifisch gegen ein Epitop des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) gerichtet ist, das in Col 1 nicht vorhanden ist, kann man das genannte Prokollagen Peptid in Körperflüssigkeiten mit großer Genauigkeit bestimmen.

EP 0 289 930 A2

Monoklonaler Antikörper zur selektiven immunologischen Bestimmung von intaktem Prokollagen Peptid (Typ III) und Prokollagen (Typ III) in Körperflüssigkeiten

Prokollagen Peptid (Typ III) ist das aminotermi-
nale Propeptid des Kollagen (Typ III), das nach
Sezernierung des Prokollagen (Typ III)-Moleküls
extrazellulär abgespalten wird. Mit einer
radioimmunologischen Bestimmungsmethode wie
sie in der Europäischen Patentschrift Nr. 4940 be-
schrieben ist, kann die Konzentration dieses Pro-
kollagen Peptids in Körperflüssigkeiten bestimmt
werden. Die Kenntnis der Serumkonzentration des
Peptids erlaubt Aussagen über die Aktivität fibroti-
scher Erkrankungen, wie Z.B. der Leber [Rohde, H.
et al. Eur. J. Clin. Invest. 9, 451 - 459 (1979)].

Die exakte, selektive Bestimmung von Prokolla-
gen Peptid (Typ III) in Serum und anderen Körper-
flüssigkeiten ist mit den bisher beschriebenen Me-
thoden aber nicht möglich, da die polyklonalen
Antikörper, die in diesen Methoden eingesetzt wer-
den, mit verschiedenen, im Serum vorkommenden
Antigenen, die zum Teil Abbauprodukte des Prokol-
lagen Peptids (Typ III) darstellen, mit unter-
schiedlicher, niedrigerer Affinität reagieren
[Niemi, O. et al. Clin. Chim. Acta 124, 39 - 44
(1982)]. Dies führt dazu, daß die Serumverdün-
nungskurven und die Verdünnungskurven anderer
Körperflüssigkeiten zur Eichkurve, die mit reinem
Prokollagen Peptid (Typ III) erstellt wird, nicht par-
allel sind und daher von jeder unbekannten Probe
der Antigengehalt in mehreren Verdünnungen be-
stimmt werden muß, um die Antigenkonzentration
über den 50 % Interzept der Verdünnungskurve zu
ermitteln.

Mit Hilfe des Verfahrens der Europäischen
Patentanmeldung 0089008 ist es möglich, dieses
technische Problem zu lösen, indem Antikörper
eingesetzt werden, die für intaktes Prokollagen
Peptid (Typ III) und sein Abbauprodukt Col I ver-
gleichbare Affinität haben. Mit diesem Verfahren
werden intaktes und degradiertes Prokollagen Pep-
tid (Typ III) gemeinsam bestimmt, was jedoch zur
Ungenauigkeit in der diagnostischen Aussage führt,
da Normalkollektiv und Patientenkollektiv stark
überlappen können.

Überraschenderweise wurde nun ein monoklo-
naler Antikörper gefunden, der nicht mit den in
Körperflüssigkeiten vorkommenden Abbauproduk-
ten des Prokollagen Peptids (Typ III) reagiert. Mit
diesem monoklonalen Antikörper ist eine
immunologische Bestimmung des aminoterminalen
Prokollagen Peptids (Typ III) ermöglicht, bei der
dessen Abbauprodukte nicht miterfaßt werden, und
die sich dadurch auszeichnet, daß Serumverdün-
nungskurven, die Verdünnungskurven anderer Kör-
perflüssigkeiten und die Eichkurve komplette Paral-
lelität zeigen.

Die Erfindung betrifft somit:

1. Einen monoklonalen Antikörper mit dem
in Figur 3 dargestellten Reaktionsmuster ge-
genüber intaktem Prokollagen (Typ III) und pN-
Kollagen (Prokollagen, dem das C-terminale Pro-
peptid fehlt, Peak 4a), intaktem aminoterminalen
Prokollagen Peptid (Typ III) (Peak 5a) sowie Col 1
und Abbauprodukten des aminoterminalen Prokol-
lagen Peptids (Typ III) mit gleichem Molekularge-
wicht wie Col 1 (Peak 6a).

2. Eine Hybridoma Zelllinie, die durch Fusion
von Zellen aus einer Myelom Linie und Lymphozy-
ten von einem zuvor mit Prokollagen Peptid (Typ
III) immunisierten Tier gebildet wird und die den
unter 1. charakterisierten Antikörper produziert.

3. Ein Verfahren zur Herstellung des unter 1.
charakterisierten Antikörpers.

4. Ein Verfahren zur quantitativen
immunologischen Bestimmung von Prokollagen
Peptid (Typ III) mit dem unter 1. charakterisierten
Antikörper.

5. Eine diagnostische Zusammensetzung zur
Feststellung der Prokollagen Peptid (Typ III)-Menge
in Körperflüssigkeiten, die aus einer wirksamen
Menge des unter 1. charakterisierten monoklonalen
Antikörpers im Gemisch mit einem diagnostisch
annehmbaren Träger besteht.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert er-
läutert, insbesondere die bevorzugten Ausführungs-
formen. Ferner wird die Erfindung in den Pate-
ntansprüchen definiert.

Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper
können Tiere, bevorzugt Nagetiere, wie Z.B.
Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, mit
Prokollagen Peptid (Typ III), das nach dem Verfah-
ren des Europäischen Patents 4940 isoliert wurde,
in Gegenwart von Adjuvans immunisiert werden.
Besonders bevorzugt werden Mäuse eingesetzt, in-
besondere solche vom SJL Stamm. Mit wiederhol-
ten Sekundärinjektionen, beispielsweise im Ab-
stand von 4 bis 8 Wochen, wird die Immunantwort
verstärkt. Der Erfolg der Immunisierung wird durch
Bestimmung der Konzentration von Antikörpern im
radioimmunologischen Bindungstest [R. Timpl und
L. Risteli, Immunochemistry of the extracellular ma-
trix, H. Furthmayr Ed., Vol. 1, 199 (1982)] kontrol-
liert. Einige Tage vor Fusion der Lymphozyten mit
einer Myelom Zelllinie werden die Tiere mit Prokol-
lagen Peptid (Typ III) ohne Adjuvans behandelt.
Lymphozyten der Tiere werden gewonnen und mit
einer Myelom Zelllinie fusioniert, die ebenfalls von
einer der oben genannten Tierspezies stammen
kann, vorzugsweise jedoch von der Maus, insbe-
sondere mit der Zelllinie P3X63AG8.653. Es werden

vorteilhaft Lymphozyten mit Myelom-Zelllinien gleicher Spezies fusioniert. Die Fusion und weitere Züchtung der Zellklone werden in einer dem Fachmann bekannten Weise durchgeführt, wobei im Überstand der Zellkultur mittels immunologischer Bindungstests die Konzentration spezifischer Antikörper bestimmt wird. Aus den aus der Fusion hervorgehenden Zellklonen werden geeignete Klone für die Verwendung in immunologischen Verfahren ausgewählt. Besonders bevorzugt wird mit einer Zelllinie gearbeitet, die durch Fusion von Lymphozyten von Mäusen des SJL-Stamms gegen Prokollagen Peptid Typ III mit der Maus Myelom-Zelllinie P3X63AG8.653 hergestellt wird. Diese Zelllinie ist bei European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, U.K. unter der Nummer 87042308 hinterlegt.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gehören in die Gruppe der Immunglobuline, bevorzugt in die Klasse der IgG-, IgA- und IgM-Proteine. Antikörper der IgG Klasse, insbesondere der Subklasse IgG2b sind besonders vorteilhaft einsetzbar. Der erfindungsgemäße Antikörper ist insbesondere deshalb überraschend, weil seine Affinität zum Antigen höher ist als die Affinität polyklonaler Antikörper. Üblicherweise wird das Gegenteil gefunden. Verdeutlicht werden die Eigenschaften der monoklonalen Antikörper anhand des aus der Zelllinie ECACC 87042308 gewonnenen monoklonalen Antikörpers PIIIP 296, wenn die im Serum vorhandenen Antigene über Gelfiltrationsschromatographie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden und die Fraktionen der Chromatographie im Radioimmunoassay eingesetzt werden. Dabei zeigt sich, daß die Antigenfraktion, die bei Analyse mit polyklonalen Antikörpern miterfaßt wird und das Molekulargewicht des Abbauprodukts Col 1 hat, von dem erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper nicht erfaßt wird. In Figur 3 ist das Elutionsprofil der Gelfiltrationsschromatographie von humanem Serum, wie es der monoklonale Antikörper zeigt, im Vergleich zum Elutionsprofil, wie es polyklonale Antikörper aufweisen, gezeigt. Peak 4/4a entspricht intaktem Prokollagen Typ III bzw. pN-Kollagen Typ III [Rohde H. et al. Eur. J. Biochem. 135, 197 (1983)]. Peak 5/5a entspricht intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid Typ III (P III P), während Peak 6/6a Col 1 entspricht sowie Abbauprodukten des aminoterminalen Prokollagen Peptids Typ III mit gleichem Molekulargewicht wie Col 1 [Rohde H. et al. Eur. J. Biochem. 135, 197 (1983)]. Die Konzentration der Stoffe in den entsprechenden Fraktionen kann mit Hilfe einer Prokollagen Peptid Typ III Eichkurve bestimmt werden.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen

Antikörper ist es wichtig, daß eine geeignete Quelle zur Gewinnung des Antigens zur Verfügung steht. Wie schon erwähnt, wird humanes oder tierisches, hochgereinigtes Prokollagen Peptid (Typ III) vorteilhaft nach dem Verfahren des Europäischen Patents 4940 isoliert, indem Gewebe oder pathologische Körperflüssigkeiten mit Kollagenase abgebaut werden und das Prokollagen Peptid aus der Reaktionslösung abgetrennt und durch Kombination von chromatographischen Methoden und/oder Immunsorbtion gereinigt wird.

Der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper kann in verschiedenen immunologischen Verfahren, einschließlich allen Formen des Radioimmunoassays, z.B. sequentielle Sättigungsanalyse oder Gleichgewichtsanalyse, ggf. nach Markierung mit Chloramin T oder Bolton-Hunter-Reagenz [Felber, Meth. Biochem. Anal. 22, 1 (1974); Shelley et al., Clin. Chem. 19, 146 (1975)] sowie in anderen kompetitiven und nicht-kompetitiven Bindungsassays, wie Fluoreszenz-, Enzym-, Chemilumineszenz- oder anderen Immunoassays, einschließlich Immunoradiometrischer Assay (IRMA) verwendet werden. Der monoklonale Antikörper kann daher in immunologischen Verfahren zur Isolierung und Charakterisierung sowie zur quantitativen Bestimmung von Prokollagen Peptid (Typ III) in Geweben und Körperflüssigkeiten eingesetzt werden. Man verfährt nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden, indem eine flüssige Probe, die Prokollagen Peptid (Typ III) enthält, mit dem erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, sei es in Lösung oder auf einem festen Träger, zur Reaktion gebracht wird und die Menge des Prokollagen Peptids (Typ III) über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Prokollagen Peptid (Typ III) noch mit dem Aminoterminal des Prokollagen (Typ III) verknüpft ist oder nicht. Die bislang bei der immunologischen Bestimmung störenden Abbauprodukte des Prokollagen Peptids (Typ III), insbesondere das Col 1, werden von dem erfindungsgemäßen Antikörper nicht miterfaßt.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung weitergehend erläutert. Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, wenn nicht anders angegeben.

Beispiel 1

Herstellung von Prokollagen-Peptid (Typ III) (P III P):

Prokollagen-Peptid (Typ III) wird hergestellt durch Einwirkung von Kollagenase auf Prokollagen (Typ III) bei 37°C. Hierbei wird das Peptid keinen Denaturierungsmitteln ausgesetzt. Zur Herstellung

größerer Mengen des Peptids wird ein modifiziertes Verfahren angewendet. Alle Verfahrensschritte bis zur Einwirkung der Kollagenase werden im Kälteraum durchgeführt. Die verschiedenen NaCl-Lösungen, die zur Löslichmachung eingesetzt werden, enthalten 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,01 M EDTA, Natriumazid (200 mg/ml) und die Protease-Inhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (3 µg/ml) und p-Chlormercuribenzoat (3 µg/ml).

Foetale Kälberhaut (3 kg) wird in 10 l 1 M NaCl homogenisiert und zwei Tage extrahiert. Gelöstes Kollagen wird aus der Extraktionslösung gefällt durch Zugabe von festem NaCl bis zu einer Endkonzentration von 2,5 M. Nach Rühren über Nacht wird das Präzipitat durch Zentrifugation gesammelt (1800 x g, 20 Minuten), zweimal mit 2,5 M NaCl gewaschen und wieder aufgelöst, indem es über Nacht in 10 l 0,5 M NaCl gerührt wird. Kleine Mengen unlöslichen Materials werden durch Zentrifugation entfernt. Die so erhaltene Mischung von Kollagen (Typ III) und Prokollagen (Typ III) wird mit 1,6 M NaCl gefällt. Das Präzipitat wird dann in 2 l 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0) suspendiert und nach Zusatz von 0,02 M CaCl₂ 20 Minuten bei 50°C erhitzt und anschließend 3 Stunden bei 37°C zusammen mit 1500 U bakterieller Kollagenase (CLSPA, Worthington, USA) pro Gramm feuchtes Präzipitat inkubiert. Nach Einwirkung der Kollagenase wird das gebildete Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt und die Lösung dialysiert gegen 0,005 M Tris-HCl, pH 8, 6,8 M Harnstoff und über eine DEAE-Cellulosesäule (5,0 x 30 cm) gegeben, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert wurde.

Die auf der Säule gebundenen Proteine werden mit NaCl-Lösungen ausgewaschen, deren Konzentration von 0 bis 0,3 M ansteigt. Die gesamte Elutionsmenge beträgt 2 l. Die aus der Säule ausfließende Lösung wird bezüglich der Adsorption bei 236 nm und ihrer Antigenaktivität durch Verwendung von Antikörpern überprüft, die spezifisch für das aminoterminal Segment des Prokollagen (Typ III) sind. Normalerweise enthält der letzte Peak, der aus der Säule eluiert wird, das Prokollagen-Peptid (Typ III). Das Peptid wird durch Dialyse gegen destilliertes Wasser entsalzt und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt auf einer Säule mit Agarose A 1,5 M (2 x 120 cm), die mit 1 M CaCl₂, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 äquilibriert ist.

Beispiel 2

Hybridoma Produktion

Mäuse vom SJL-Stamm werden mit 5 µg Prokollagen Peptid (Typ III), das nach Beispiel 1 erhal-

ten wurde, in Gegenwart von komplettem Freund'schen Adjuvans intramuskulär immunisiert. Nach 4 Wochen und nach drei Monaten wird die Immunreaktion durch eine weitere intramuskuläre Injektion von 5 µg Prokollagen Peptid (Typ III) in Gegenwart von inkomplettem Freund'schen Adjuvans verstärkt. Drei Tage vor der Fusion wird die Immunantwort durch intraperitoneale Injektion von weiteren 50 µg Prokollagen Peptid (Typ III) verstärkt.

Zur Fusion werden die Tiere getötet und die Milzzellen isoliert. In Gegenwart von Polyethylenglykol werden die Milzzellen mit der Myeloma Zelllinie P3X63AG8.653 fusioniert. Durch Kultivierung der Fusionsmischung in Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium über einen Zeitraum von zwei Wochen wird auf Milzzell x P3X63AG8.653-Hybride selektioniert. Zur Erreichung einer stabilen Zelllinie werden die erhaltenen Zellklone mehrfach subkloniert. Die entstandenen Zellkolonien werden im radioimmunologischen Bindungstest auf Antikörperproduktion getestet. Die entstandene Zelllinie, aus der man den monoklonalen Antikörper P III P 296 gewinnt, ist bei ECACC unter der Nummer 87042308 hinterlegt.

Beispiel 3

Radioimmun-Bindungstest

300 µl Zellkulturüberstand oder andere Probe, wie z.B. Aszites nach Züchtung von Zellen in der Bauchhöhle von Mäusen, werden mit 100 µl einer ¹²⁵J Prokollagen Peptid (Typ III) Lösung (1 ng Protein/100 µl hergestellt wie in EP 4940, Beispiel 1, beschrieben) über Nacht inkubiert. Die gebildeten Antigen-Antikörper Komplexe werden durch Zugabe von Anti Maus IgG Serum vom Schaf oder einer anderen Spezies ausgefällt. Nach Zentrifugation und Dekantieren des Überstands wird die Menge der präzipitierten Radioaktivität im γ-Szintillationsspektrometer bestimmt.

Beispiel 4

Radioimmun Test

0,2 ml der zu analysierenden Probe oder des Prokollagen Peptid (Typ III)-Standards werden mit einer in Bezug auf die Menge des markierten Antigens limitierenden Menge von PIIP 296 (in 0,1 ml Puffer) und 0,1 ml ¹²⁵J-markiertem Prokollagen Peptids (Typ III) (enthält 1 ng Protein) über Nacht

bei 4°C inkubiert. Anschließend wird mit einer vorher ausgetesteten Menge Anti Maus IgG Serum vom Schaf in Gegenwart von 10 % Polyethylenglykol (PEG 6000) 1 h inkubiert. Die gefällten Antigen-Antikörper-Komplexe werden abzentrifugiert (1500 × g) und nach Dekantieren wird im γ -Szintillationspektrometer die Radioaktivität bestimmt.

Durch Vergleich mit einer Eichkurve, zu deren Erstellung Standards mit unterschiedlichen Mengen Prokollagen Peptid (Typ III) eingesetzt werden, kann dann die Konzentration von Prokollagen Peptid (Typ III) in der unbekannten Lösung bestimmt werden. Figur 1 zeigt die Eichkurve (1) und Serumverdünnungskurven (2) mit PIIP 296 (a) im Vergleich zum Verfahren nach EP 4940 mit polyklonalen Antikörpern (b).

Beispiel 5

Radioaktive Markierung des P III P 296 0,2 ml einer Lösung mit 0,2 mg des monoklonalen P III P 296 in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 werden in einem PolystyrolTeströhrchen (12 × 55 mm) vorgelegt und mit 100 MBq Na¹²⁵J-Lösung, abgepuffert mit 10 μ l 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,4, versetzt. Nach Zusatz von 50 μ l einer wäßrigen Lösung von 20 μ g Chloramin T wird 1 min gemischt. Anschließend wird die Jodierungsreaktion durch Zugabe von 50 μ l einer wäßrigen Lösung von 20 μ g Natriumdisulfit beendet.

Das nicht umgesetzte Na¹²⁵J wird anschließend von dem ¹²⁵J-markierten P III P 296 durch Chromatographie an einem Anionenaustauscher abgetrennt. Die chromatographischen Fraktionen, die den aufgereinigten ¹²⁵J-markierten Antikörper enthalten, werden mit einer Lösung aus 20 g Tween 20 und 14,6 g Na₂EDTA in einem Liter 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 verdünnt, so daß die Konzentration des markierten Antikörpers 200 μ g/l beträgt.

Beispiel 6

Antikörperbeschichtung von Teströhrchen

Zur Fixierung der Antikörper auf Polystyrolteströhrchen (12 × 75 mm) werden in jedes Röhrchen 300 μ l einer Lösung von 4 mg monoklonalem P III P 296 pro Liter 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 6,4 gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Antikörperlösung abgesaugt. Danach werden in jedes Röhrchen 500 μ l einer 1%igen Lösung von Rinder-

serumalbumin in 0,05 M Tris-Citrat-Puffer pH 7,5 gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung abgesaugt. Die Antikörper-beschichteten Röhrchen werden über Silikagel getrocknet.

Beispiel 7

Immunradiometrischer Test

0,1 ml der zu analysierenden Probe oder 0,1 ml des Prokollagen (Typ III)-standards werden in PolystyrolTeströhrchen, die zuvor mit 1,2 μ g des monoklonalen P III P 296 beschichtet wurden, unter Zusatz von 0,1 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Teströhrchen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und dekantiert. Danach werden in die Röhrchen 200 μ l ¹²⁵J-markierter monoklonaler P III P-Antikörper (enthält 40 ng Antikörper) gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Radioaktivität der an der Teströhrchenwand gebundenen Antikörper-Antigen-¹²⁵J-Antikörperkomplexe wird nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml PBS und anschließendem Dekantieren im Szintillationsmeßgerät bestimmt.

Durch Vergleich mit einer Eichkurve, zu deren Einstellung Standards mit unterschiedlichen Mengen Prokollagen-Peptid (Typ III) eingesetzt werden, kann dann die Konzentration von Prokollagen-Peptid (Typ III) in der unbekannten Probenlösung berechnet werden. Die Fig. 2 zeigt die Eichkurve des radioimmunometrischen Assays. (B/T bedeutet: Antikörper gebunden/gesamt).

Beispiel 9

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der mit PIIP 296 reagierenden Antigene in humanem Serum

1 ml Serum werden per Gelfiltrationsschromatographie über ein Allyldextran vernetzt mit N,N'-Methylenbisacrylamid [®Sephacryl S 300 Säule (1,6 × 130 cm)], äquiliibriert in "Phosphate buffered Saline" (PBS) mit 0,04 % eines nicht-ionischen Detergens, beispielsweise eines polyethoxylierten Sorbitan-monolaurats (Tween 20), in Fraktionen mit 3,3 ml aufgetrennt. Je 0,2 ml der Fraktionen werden in den Radioimmuntest nach Beispiel 4 eingesetzt. Figur 3 zeigt das Elutionsprofil des mittels PIIP 296 bestimmten Antigens im Vergleich zum Profil des mit Hilfe der polyklonalen Antikör-

per bestimmten Antigens:

Peak 4/4a entspricht pN Kollagen und intaktem aminoterminalen Prokollagen (Typ III)

Peak 5/5a entspricht aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) = (P III P)

Peak 6/6a entspricht Col 1 sowie Abbauprodukten des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) mit gleichem Molekulargewicht wie Col 1.

Die Konzentration der Stoffe in den entsprechenden Fraktionen kann mit Hilfe einer Prokollagen Peptid (Typ III) Eichkurve bestimmt werden.

Ansprüche

1. Monoklonaler Antikörper mit dem in Figur 3 dargestellten Reaktionsmuster gegenüber intaktem Prokollagen (Typ III) und pN-Kollagen (Peak 4a), intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) (Peak 5a) sowie Col 1 und Abbauprodukten des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) mit gleichem Molekulargewicht wie Col 1 (Peak 6a).

2. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 mit spezifischer Wirkung gegen ein Epitop des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III), das in Col 1 nicht vorhanden ist.

3. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er der Klasse IgG zugeordnet wird.

4. Monoklonaler Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er durch ein Hybridom gebildet wird, das durch Fusion von Zellen einer Myelom Linie und von Lymphozyten eines zuvor mit Prokollagen Peptid Typ III immunisierten Tieres entstanden ist.

5. Monoklonaler Antikörper PIIIP 296 der Hybridoma Zelllinie ECACC 87042308.

6. Hybridoma Zelllinie, die einen Antikörper gemäß der Ansprüche 1 bis 5 produziert, gebildet durch Fusion von Zellen aus einer Myelom-Zelllinie und von Lymphozyten eines zuvor mit Prokollagen Peptid (Typ III) immunisierten Tieres.

7. Die Hybridoma Zelllinie ECACC 87042308.

8. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III), dadurch gekennzeichnet, daß

a) Tiere mit aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) immunisiert werden,

b) Lymphozyten gewonnen und mit Myelom-Zellen fusioniert werden,

c) die Hybride hinsichtlich des Vorliegens eines Antikörpers mit den in einem der Ansprüche 1 bis 5 angegebenen Eigenschaften ausgewählt und geklont werden und

d) der Antikörper aus den genannten Klonen gewonnen wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ausführung des Schritts d) die Hybridoma Zelllinie ECACC 87042308 eingesetzt wird.

10. Verfahren zur quantitativen immunologischen Bestimmung von Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß

a) eine flüssige Probe, die aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) oder Prokollagen (Typ III) enthält, mit einem monoklonalen Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 zur Reaktion gebracht wird und

b) die Menge des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) bzw. das Prokollagen über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird.

11. Diagnostische Zusammensetzung zur Feststellung der Prokollagen Peptid (Typ III)-Menge in Körperflüssigkeiten, gekennzeichnet durch eine wirksame Menge des monoklonalen Antikörpers nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 im Gemisch mit einem diagnostisch annehmbaren Träger.

Patentansprüche für die folgenden Vertragsstaaten: ES und GR

1. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III), dadurch gekennzeichnet, daß

a) Tiere mit aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) immunisiert werden,

b) Lymphozyten gewonnen und mit Myelom-Zellen fusioniert werden,

c) die Hybride hinsichtlich des Vorliegens eines Antikörpers mit den in einem der Ansprüche 1 bis 5 angegebenen Eigenschaften ausgewählt und geklont werden und

d) der monoklonale Antikörper mit dem in Figur 3 dargestellten Reaktionsmuster gegenüber intaktem Prokollagen (Typ III) und PN-Kollagen (Peak 4a), intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) (Peak 5a) sowie Col 1 und Abbauprodukten des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) mit gleichem Molekulargewicht wie Col 1 (Peak 6a) aus den genannten Klonen gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ausführung des Schritts d) die Hybridoma Zelllinie ECACC 87042308 eingesetzt wird.

3. Verfahren zur quantitativen immunologischen Bestimmung von Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß

a) eine flüssige Probe, die aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) oder Prokollagen (Typ III) enthält, mit dem nach Anspruch 1 erhältlichen monoklonalen Antikörper zur Reaktion gebracht wird und

5

b) die Menge des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) bzw. das Prokollagen über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

7

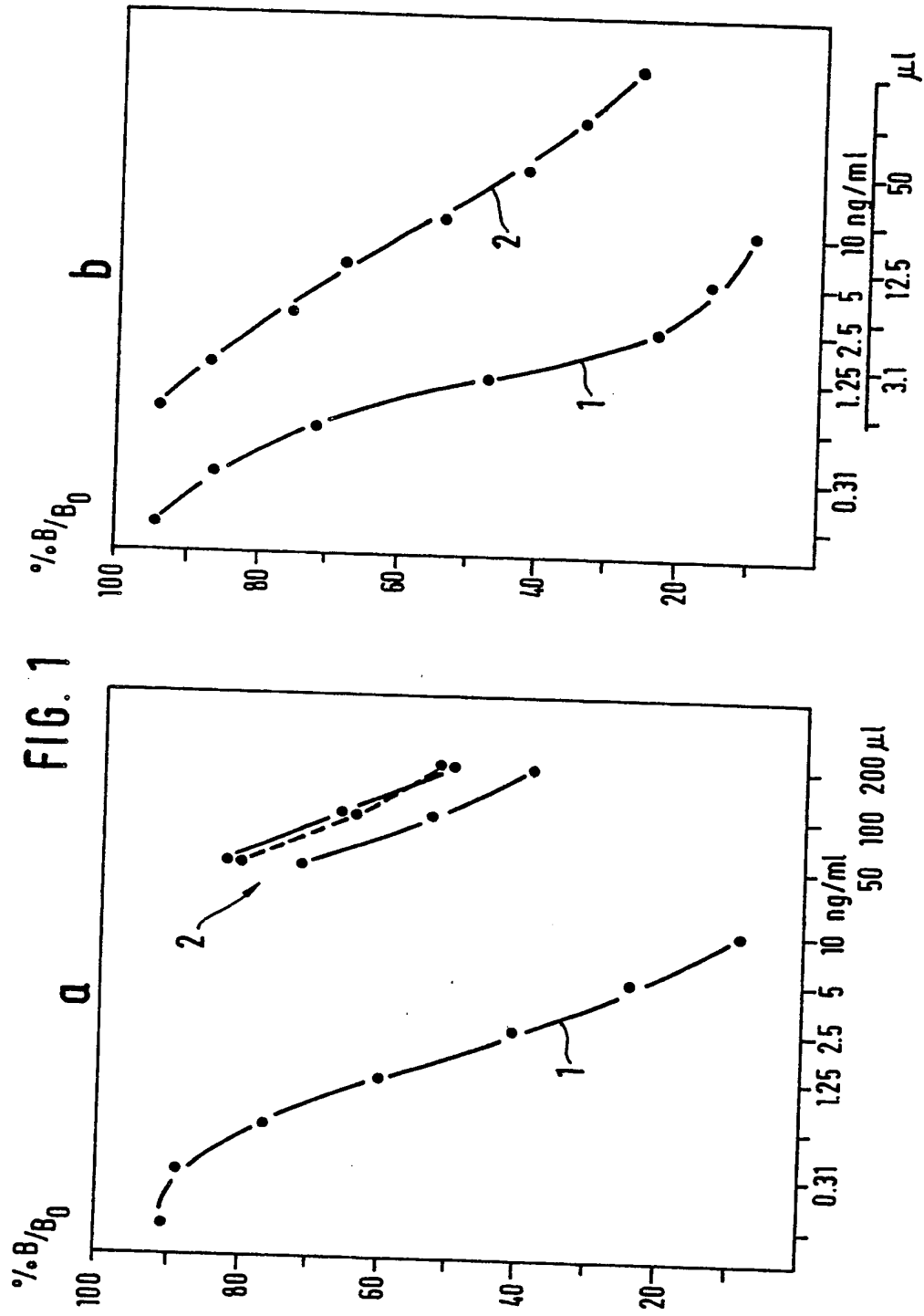


FIG. 2

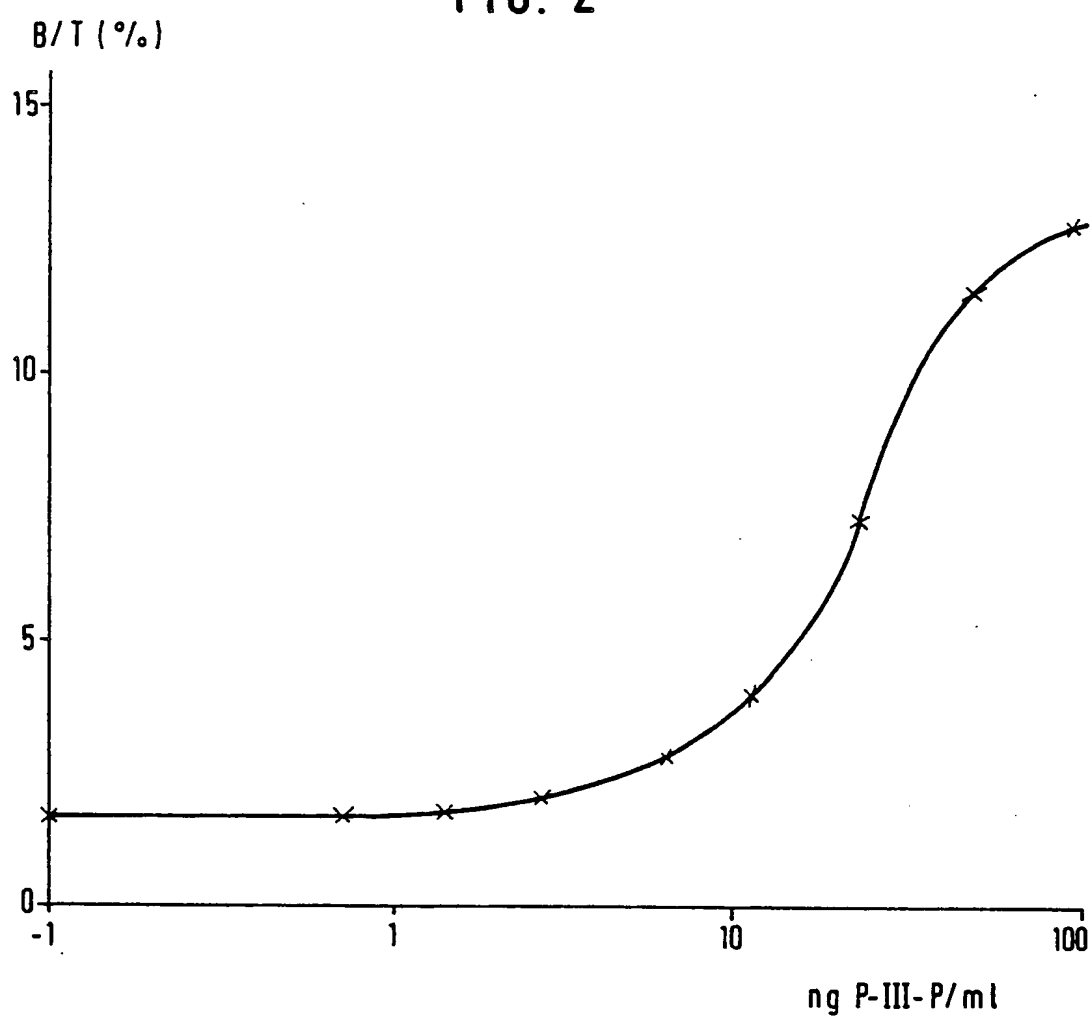
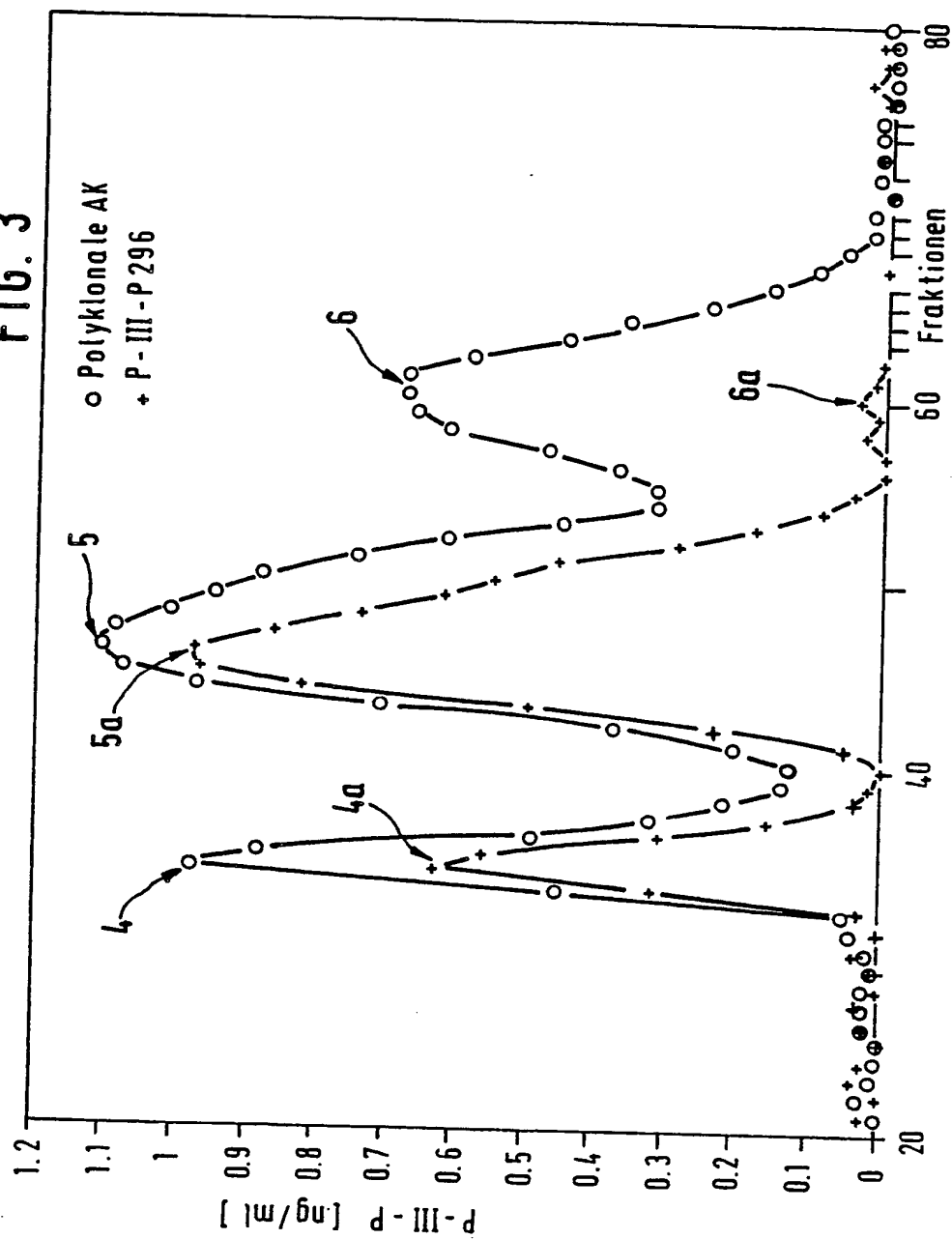


FIG. 3





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 289 930 A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **88106748.2**

(51) Int. Cl.⁵: **C12P 21/00, C07K 15/00,
C12N 15/00, C12N 5/00,
G01N 33/577, G01N 33/68**

(22) Anmeldetag: **27.04.88**

(30) Priorität: **02.05.87 DE 3714633**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
09.11.88 Patentblatt 88/45

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: **12.06.91 Patentblatt 91/24**

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur**
Förderung der Wissenschaften e.V.
Bunsenstrasse 10
W-3400 Göttingen(DE)

(72) Erfinder: **Brocks, Dietrich, Dr.**
Goethering 9
W-6200 Wiesbaden(DE)
Erfinder: **Pünter, Jürgen, Dr.**
Reichenberger Weg 11
W-6238 Hofheim am Taunus(DE)
Erfinder: **Strecker, Helmut, Dr.**

Verstorben(DE)
Erfinder: **Timpl, Rupert, Dr.**
Julius-Haerlingstrasse 3
W-8035 Gauting(DE)

(54) **Monoklonaler Antikörper zur selektiven immunologischen Bestimmung von intaktem Prokollagen Peptid (Typ III) und Prokollagen (Typ III) in Körperflüssigkeiten.**

(57) Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers der spezifisch gegen ein Epitop des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) gerichtet ist, das in Col 1 nicht vorhanden ist, kann man das genannte Prokollagen Peptid in Körperflüssigkeiten mit großer Genauigkeit bestimmen.

EP 0 289 930 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 10 6748

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE					
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)		
Y	CLIN. CHEM., Band 31, Nr. 8, 1985, Seiten 1301-1304; O. NIEMELÄ: "Radioimmunoassays for type III procollagen amino-terminal peptides in humans" * Insgesamt * -----	1-8,10,11	C 12 P 21/00 C 07 K 15/00 C 12 N 15/00 C 12 N 5/00 G 01 N 33/577 G 01 N 33/68		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)		
			C 12 P G 01 N A 61 K		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt					
Recherchenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 28 Februar 91	Prüfer OSBORNE H.H.		
<table><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument				